

고추역병 생물적방제 근권세균의 선발 및 근권정착 능력 연구

장리경 · 사홍종¹ · 왕정정 · 상숙한 · 신순선*중국 하남농업대학 식물보호학원, ¹중국 신양농업고등전문대학Selection of Biocontrol Agents against *Phytophthora* Blight of Pepper and Its Root Colonization Ability

Li-Jing Zhang, Hong-Zhong Shi, Jing-Jing Wang, Shu-Xian Chang and Shun-Shan Shen*

College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

¹Xinyang Agricultural College, Xinyang 464000, China

(Received on April 9, 2010; Accepted on June 23, 2010)

Four promising biocontrol agents against *Phytophthora capsici* were selected from 507 bacterial isolates collected from rhizosphere soils and roots of pepper plants. *In vitro* experiment, these four biocontrol agents inhibited mycelial growth, germination of cystospores, and formation of zoosporangia and zoospores of *Phytophthora capsici*. In the pot experiment, the four biocontrol agents showed control efficiency higher than 70%. In greenhouse experiment, the isolates G28-6 gave the control value of 79.4%. These four biocontrol agents successfully colonized in the population density beyond 10^5 cfu/g on roots of pepper *in vitro*. The isolates G28-6 was identified as *Pseudomonas aurantiaca*, based on its cultural, morphological, and biochemical characterization and 16S rRNA gene sequence analysis.

Keywords : Biocontrol agent, *Phytophthora* blight of pepper, Root colonization

고추는 중요한 조미채소로 세계적으로 재배면적은 계속적으로 증가함과 동시에 각종 병해충으로 인한 수량 손실이 해마다 늘고 있다. 고추역병은 고추 재배에 있어서 가장 많은 수량 손실을 일으키는 요인 중의 하나이며 현재 고추역병의 방제는 주로 유기합성 농약을 사용하여 수행되고 있다(Yin, 2007). 그러나 이런 유기합성농약의 오·남용은 저항성 균주의 출현, 오존층의 파괴, 토양과 작물 내의 잔류 등의 문제를 야기시킨다. 현재 널리 사용되고 있는 토양 훈증제는 토양 미생물상을 파괴시키므로 유기합성 농약을 대체하기 위한 많은 연구들이 이루어지고 있다(Weller, 1988). 그중에도 환경친화적인 방제방법으로 유용미생물을 이용한 생물적 방제가 가장 바람직한 방제 방법으로 대두되고 있다. 유용미생물을 이용한 생물비료나 생물농약 개발은 세계적으로 활발히 진행되고 있으며 일부는 상용화되고 있다. 근두암중병의 방제를 위한

Agrobacterium radiobacter K84, 원예작물병 방제를 위한 *Bacillus subtilis*를 이용한 Quantum4000와 Kodiak 등의 제제는 현재 미국 등에서 널리 사용되고 있으며, *Pseudomonas* spp.에 의한 토양 병원균의 생물적 방제 연구도 분자생물학적 접근과 실용화 연구가 이루어지고 있다(Keer, 1980; Siddiqui, 2003; Mena, 2007). 또한, 미국 코넬대에서 개발한 길항 곰팡이 *Trichoderma harzianum*은 Gustafson 회사에 의해 상업화 되었으며, 잘록병에 대한 길항 진균인 *Gliocladium virens*는 Garace 회사에 의해 Gliogard라는 상품명으로 제형화 되었다(Spadaro, 2005). 길항 미생물을 이용한 고추역병 생물적 방제연구도 활발하게 진행되고 있지만 아직 실용화되지 않았다(Yin, 2007).

길항근권세균의 토양병 방제 능력은 길항근권세균이 작물 근권에 얼마나 정착할 수 있는가에 따라 결정된다. 특히, 토양의 물리 화학적 상태, 근권 미생물상, 작물의 종류에 따라 길항 근권세균이 정착력은 큰 차이를 나타낸다(Zhang, 2000). 실험실에서 제한된 조건으로 선발된 길항능력을 갖는 미생물들이 근권에서의 정착력이 떨어지

*Corresponding author

Phone) +86-135-9266-0053, Fax) +86-371-6355-8170

Email) shen0426@hanmail.net

포장에서는 길항 효과를 발휘하지 못하는 경우가 매우 많다. 그러므로, 식물체의 근권에서 세균을 분리하여 토양 병을 억제시키는 길항세균을 선발하거나, 생활사의 전체 혹은 일부분을 식물체의 조직에 침투하여 병을 일으키지 않고 생존하는 내생균을 선발하여 식물병을 억제시키는 연구가 많이 이루어지고 있다(Shen, 2005). 본 연구는 고추역병의 생물적 방제를 위한 근권세균을 선발하여 고추역병균에 대한 억제 효과와 근권정착 능력을 탐색하여 실제 상용화 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

고추역병균. 실험에 사용된 고추역병균은 본 실험실에서 분리 동정하여 병원성을 확인한 균주이다.

근권세균의 분리 및 선발. 하남성지역의 고추역병 발병포장에서 건전한 고추뿌리와 근권 토양을 채집하여 토양평판희석법으로 근권세균을 분리하였다. 분리된 근권세균들의 고추역병균에 대한 길항효과는 PDK(Potato Dextrose Broth 20 g, Peptone 10 g, Agar 15 g, 증류수 1000 ml) 배지에서 *P. capsici*와 대치배양한 후, 병원균의 균사생장 저지원(inhibition zone)의 크기에 따라 길항효과가 우수한 균주를 1차적으로 선발하였다.

길항세균의 고추역병균에 대한 억제효과 검증. *In vitro*에서 선발된 균주들이 *P. capsici*의 유주자낭형성, 유주자낭의 유주자 방출, 피낭포자의 발아에 대한 억제 효과를 검증하였다. V8A(V8 juice 100 ml, CaCO₃ 1 g, Agar 15 g, 증류수 900 ml)에서 자란 고추역병균을 corker borer(8 mm)로 잘라내어 새로운 Petri plate에 옮기고 길항세균 현탁액(10⁸ cfu/ml)을 균사가 잠길 정도로 첨가하여 25°C 형광등 아래에서 16시간 배양한 후 유주자낭 형성수를 현미경하에서 조사하여 길항세균의 고추역병 유주자낭 형성에 대한 억제효과를 검증하였고, 살균수에서 형성된 고추역병균의 유주자낭에 길항세균 현탁액을 첨가하여 4°C에서 30분 처리하고 25°C에서 30분 배양하여 유주자 방출을 유발한 후, 현미경하에서 유주자를 방출하고 남은 유주자낭 빈 껍데기수와 유주자낭수를 비교하여 유주자낭의 유주자 방출에 대한 억제효과를 검증하였고, 고추역병균 피낭포자현탁액과 길항세균 현탁액을 같은 비율로 혼합하여 slide glass에 일정한 양을 떨어뜨린 후 25°C 인큐베이터에서 배양하면서 2시간 간격으로 발아율을 조사하였다.

길항세균의 고추역병 방제 효과 검증. 원예용 상토에 파종하여 50일 정도 육묘한 고추(품종: 豫園新 16-A) 묘를 길항균 현탁액에 1시간 침지 처리하여 Pot(직경 10 cm)에 옮겨 심고 고추역병균 유주자현탁액(10⁴ 유주자/ml,

5 ml/주)를 접종한 후 온실에서 배양하였다. 처리 7일 후 고추역병 발병율을 조사하여 방제가를 환산하였다. 화학농약(80%Mancozeb 1000배액)과 무처리를 대조로 하였다. 처리당 10주씩 4반복으로 하였다. 포트시험에서 역병 방제 효과가 뚜렷한 G28-6균주를 선발하여 고추역병 자연발생 비닐하우스에서 고추역병 방제효과 검증시험을 하였다. 50일된 고추유묘를 G28-6현탁액에 1시간 침지하여 비닐하우스에 이식한 후 본 지역 재배농가들의 관리방법대로 관리하였고 이식 60일 뒤 고추역병 발병율을 조사하였다. 화학농약(80%Mancozeb 1000배액)과 무처리를 대조구로 설치하였다. 처리당 50주씩 4반복으로 하였다.

근권정착 밀도 측정. 선발된 길항세균의 근권정착능력을 검증하기 위하여 Double Layer Filter Paper(DLF)법을 이용하였다. DLF법은 살균한 Petri plate에 Filter paper 한 장을 깔고 살균수 4.5 ml를 첨가한 후 그 위에 길항세균 현탁액(10⁸ cfu/ml)에 한시간 침지시킨 고추종자를 올려놓고 위에 Filter paper를 덮은 후 28°C의 암조건에서 배양하여 자라난 뿌리 끝부분 1 cm를 잘라내고 분쇄하여 0.1 mol/l MgSO₄ 용액에 희석하여 1/10 TSA배지에 도말하였다. 도말한 후 28°C 인큐베이터에서 2일 정도 배양하여 형성된 colony수로 뿌리에 정착한 근권세균의 밀도를 환산하였다.

길항세균의 동정. G28-6균주의 동정에 필요한 형태적 생리적 특성들은 Bergey's manual of Systematic Bacteriology를 기준으로 하여 분석하였고 G28-6의 16S rDNA의 염기서열을 NCBI BLAST search하여 분석하였다. PCR은 oligonucleotide primer 27f (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG)와 1492r(TAC GGH TAC CTT ACG ACTT)를 사용하였고 denaturation, annealing 그리고 extension 온도는 92°C, 55°C 그리고 72°C로 30cycle 진행하였고 Sequencing vector는 pBluescript II SK(+), compliment bacteria는 DH5 α 를 사용하였다.

결과 및 고찰

길항세균의 분리 및 선발. 하남성지역의 고추역병 발병포장에서 건전한 고추뿌리와 근권토양으로 부터 세균 507균주를 분리하였는데, 그중에서 고추역병균과의 대치배양에서 우수한 길항력을 보이는 균주 G28-6, G28-5, I7-6과 H14-1균주를 선발하였다(Table 1, Fig. 1).

고추역병균에 대한 억제 효과. *In vitro*에서 선발된 길항세균들의 고추역병균에 대한 억제효과를 검증한 결과, G28-6, G28-5, I7-6과 H14-1 모두 역병균의 균사생장을 억제할 뿐만 아니라 역병균의 유주자낭과 유주자의 형성, 그리고 피낭포자의 발아를 효과적으로 억제하였는데, 그

Table 1. Inhibition of mycelial growth of *Phytophthora capsici* by the selected bacterial isolates on PDK medium

Isolates	Inhibition zone (mm)
G28-6	11±0.17
G28-5	11±0.14
I7-6	13±0.14
H14-1	11±0.18

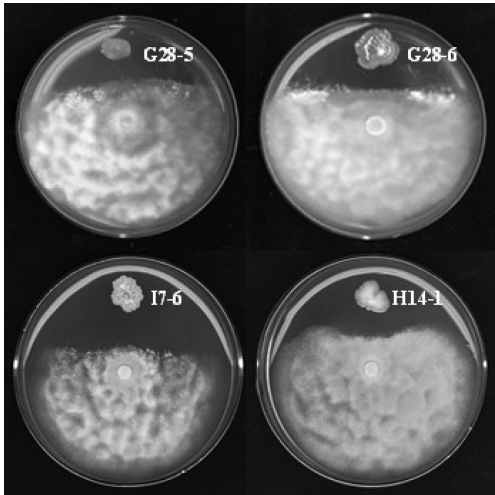


Fig. 1. Inhibition of mycelial growth of *Phytophthora capsici* by the selected bacterial isolates on PDK medium.

Table 2. Inhibition of zoosporangia formation of *Phytophthora capsici* by the selected 4 isolates

Isolates	Rate of zoosporangia formation	Inhibition rate (%)
G28-6	18.41 c	85.19
G28-5	29.13 bc	76.57
I7-6	24.89 bc	79.98
H14-1	45.23 b	63.62
Control (DW)	124.33 a	-

*Data followed by the same letter in each column are not significantly different based on Duncan's multiple range test ($P=0.05$).

Table 3. Inhibition of zoospore formation of *Phytophthora capsici* by the selected 4 isolates

Isolates	Rate of zoospore formation (%)	Inhibition rate (%)
G28-6	27.96 c*	66.91
G28-5	37.22 bc	55.95
I7-6	37.33 bc	55.82
H14-1	39.82 bc	52.87
Control (DW)	84.49 a	-

*Data followed by the same letter in each column are not significantly different based on Duncan's multiple range test ($P=0.05$).

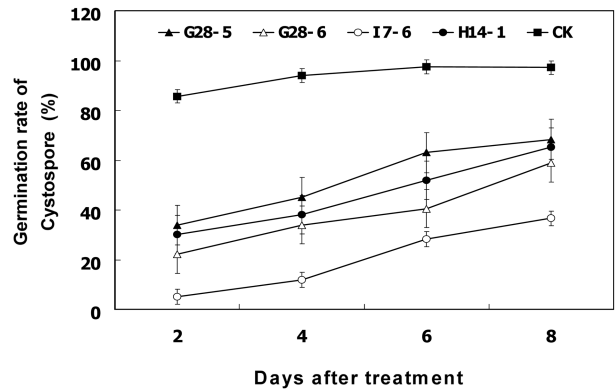


Fig. 2. Inhibition of zoospores germination of *Phytophthora capsici* by the selected 4 isolates. Error bars represent the standard deviation.

중에서도 G28-6과 I7-6의 억제 효과가 뚜렷하였다(Table 2, 3, Fig. 2). 고추역병균은 균사나 난포자 상태로 토양에서 월동하여 다음 작기의 전염원이 되는데 난포자는 발아하여 유주자낭을 형성하고 유주자낭은 직접 발아하거나 유주자를 형성하여 토양수분을 따라 능동적으로 이동하여 기주체에 도달하여 식물체에 침입하는 1차 전염원이 된다. 병환부에서는 수많은 유주자낭이 형성되어 제2차 전염원의 역할을 하며 빗물에 씻겨 내려와 토양표면에 있던 유주자들은 강우시 튀겨 올라 지상부 전 부위에 전파된다(Hwang, 1995). 고추역병은 고추 전 생육기간 동안 유주자낭과 유주자에 의하여 전염된다. 본 실험에서 선발된 길항세균들 모두 고추역병균의 전염원의 발아나 형성을 억제함으로 역병방제 길항세균으로서의 잠재력을 가지고 있다.

고추역병 방제효과. Pot 시험에서 선발된 4균주 모두 70% 이상의 고추역병 방제효과를 보였는데, 특히 G28-6은 90%의 방제가를 보여 시험에 공시된 화학농약 80% Mancozeb 보다도 방제 효과가 뚜렷하였다(Table 4). Pot 시험에서 방제효과가 우수하였던 G28-6균주를 고추역병 자연발생 비닐하우스에서 고추역병 방제효과를 검정한 결과, 79.4%의 방제가를 보여 화학농약의 방제가 48.4%보다 훨씬 높은 방제효과를 보였다(Table 5). G28-6은 pot에서 뿐만 아니라 실제 비닐하우스에서도 고추역병을 현저하게 억제할 수 있어 고추역병 방제 길항 미생물로서의 개발 가능성을 나타냈다.

근권 정착 능력. *In vitro*에서 DLF 검정법으로 선발된 길항세균들의 근권정착능력을 측정된 결과, 선발된 4균주 모두 우수한 근권정착능력을 보였다(Table 6). 토양병의 생물적 방제에 있어서 외부에서 도입된 미생물이 안정적으로 근권토양과 식물뿌리에 정착하는 것은 생물적 방제

Table 4. Effect of biocontrol of Phytophthora blight of pepper by selected 4 isolates in pots

Isolates	Disease incidence (%)	Control efficiency (%)
G28-6	10.0 c	90.0
G28-5	30.0 b	70.0
I7-6	20.0 bc	80.0
H14-1	30.0 b	70.0
Chemical	30.0 b	70.0
Control	100.0 a	-

*Data followed by the same letter in each column are not significantly different based on Duncan's multiple range test ($P=0.05$).

Table 5. Effect of biocontrol of Phytophthora blight of pepper by G28-6 in green house

Isolates	Disease incidence (%)	Control efficiency (%)
G28-6	4.2 c	79.4
Chemical	10.5 b	48.4
Control	20.3 a	-

*Data followed by the same letter in each column are not significantly different based on Duncan's multiple range test ($P=0.05$).

Table 6. The colonization of selected 4 isolates on the root of pepper

Isolates	Root colonization density (cfu/cm root)
G28-6	6.37×10^5
G28-5	4.42×10^5
I7-6	1.76×10^5
H14-1	2.51×10^5

성공 여부의 관건이라고 할 수 있다(Zhang 등, 2000). 본 연구에서 선발된 고추역병 길항근권세균 G28-6, G28-5, I7-6과 H14-1 모두 효과적으로 고추뿌리에 정착하였고, 포트시험에서 역병방제 효과가 우수하였던 G28-6은 비닐 하우스시험에서 고추생육기간 근권토양과 고추뿌리에서 일정한 정착밀도를 유지하여 고추역병을 효과적으로 방제하였다(시험결과 미제시).

길항 세균 동정 결과. 고추역병 방제에 우수한 길항세균으로 선발된 G28-6균주의 16S rRNA gene 염기서열을 분석한 결과 *Pseudomonas aurantiaca*와 99%의 상동성을 나타냈고, 형태적 특성과 생리적 특성들도 Bergey's manual of Systematic Bacteriology를 기준으로 비교하여 거의 유사하였다(Table 7). 그러므로, G28-6균주를 *Pseudomonas aurantiaca*로 동정하였다.

Table 7. Comparison of the characteristics of antagonistic bacterial isolate G28-6

Characteristics	<i>P. aurantiaca</i>	G28-6
Gram reaction	-	-
Cell form	straight rod	straight rod
Flagellum	Single flagella	Single flagella
Cell size	0.6-1 μ m, 1.2-3 μ m	0.7-1 μ m, 1.3-2.6 μ m
Mobility	+	+
Aerobic growth	+	+
Pigment	+	+
Growth in NaCl		
2%	+	+
5%	+	+
7%	+	+
Gelatinase	+	+
Starch hydrolysis	-	-
Nitrous acid deoxidation reaction	-	-
Nitrate deoxidation reaction	+	+
Glucose oxidizes	+	+
Chitinase		+

요 약

하남성지역의 고추역병 발병포장 건전한 고추뿌리와 근권토양에서 세균 507균주를 분리하였는데, 그중에서 고추역병균에 길항효과가 우수한 G28-6, G28-5, I7-6과 H14-1균주를 선발하였다. *In vitro*에서 선발된 균주들은 고추역병균의 균사생장, 유주자낭과 유주자 형성, 그리고 피낭포자의 발아를 현저하게 억제하였고, Pot시험에서 선발된 균주 모두 70% 이상의 방제효과를 나타냈고, 포트시험에서 방제효과가 우수하였던 G28-6균주는 고추역병 자연발생 비닐하우스에서 79.4%의 방제가를 보여 공시된 화학농약 80% Mancozeb 보다 훨씬 높은 방제효과를 보였다. 뿐만 아니라 선발된 4균주 모두 *in vitro*에서 우수한 근권정착능력을 보였다. 고추역병 방제에 우수한 길항세균으로 선발된 G28-6균주의 16S rRNA gene 염기서열 분석과 그의 형태적, 생리적 특성들을 Bergey's manual of Systematic Bacteriology를 기준으로 비교하여 *Pseudomonas aurantiaca*로 동정하였다.

감사의 글

본 연구는 하남성과학기술계획과제(092102110096, 10400015) 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Hwang, B. K. and Kim, C. H. 1995. Phytophthora blight of pepper and its control in Korea. *Plant Dis.* 79: 221-227.
- Keer, A. 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* 64: 25-30.
- Mena violante, H. G. and Olalde Portugal, V. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth promoting rhizobacteria(PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae* 113: 103-106.
- Shen, S. S., Choi, O. H., Park, S. H. and Park, C. S. 2005. Root Colonizing and Biocontrol Competency of *Serratia plymuthica* A21-4 against Phytophthora Blight of Pepper. *Plant Pathol. J.* 21: 64-67.
- Siddiqui, I. A. and Shaukat, S. S. 2003. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root infecting fungi in tomato. *J. Phytopathology* 151: 215-222.
- Spadaro, D. and Gullino, M. L. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection* 24: 601-613.
- Weller, D. M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathology*. 96: 379-407.
- Yin, J. F., Zhang, W. H., Li, J. Q., Li, Y. H., Hou, H. L. and Zhou, X. Y. 2007. Screening and antagonistic mechanism of biocontrol agents against Phytophthora blight of pepper. *Acta Phytopathologica Sinica*. 37: 88-94.
- Zhang, B. X., Zhang, P. and Chen, X. B. 2000. Factors affecting colonization of introduced microorganisms on plant roots. *Chinese Journal of Applied Ecology*. 11: 951-953.